

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類7 G01N 31/00, 21/75, 33/68, 33/52</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/16094</p> <p>(43) 国際公開日 2000年3月23日 (23.03.00)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/04933</p> <p>(22) 国際出願日 1999年9月10日 (10.09.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/256839 1998年9月10日 (10.09.98) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 富士写真フイルム株式会社 (FUJI PHOTO FILM CO., LTD.) [JP/JP] 〒250-0193 神奈川県南足柄市中沼210番地 Kanagawa, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 根守良一 (NEMORI, Ryoichi) [JP/JP] 西垣純爾 (NISHIGAKI, Junji) [JP/JP] 田村 裕 (TAMURA, Yutaka) [JP/JP] 〒250-0193 神奈川県南足柄市中沼210番地 富士写真フイルム株式会社 足柄研究所内 Kanagawa, (JP)</p> <p>(74) 代理人 今村正純, 外 (IMAMURA, Masazumi et al.) 〒104-0031 東京都中央区京橋一丁目5番5号 KRFビル5階 Tokyo, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書 請求の範囲の補正の期限前の公開 ; 補正書受領の際には再公開される。</p>
<p>(54) Title: METHOD OF DETECTING THIOL-CONTAINING COMPOUND</p> <p>(54) 発明の名称 チオール基含有化合物の測定方法</p> <p>(57) Abstract A method of detecting thiol-containing compounds which comprises the step (1) of contacting a sample containing a thiol-containing compound with a thin film comprising a hydrophilic binder and fine particles of a substance selected from the group consisting of metals and metal compounds and the step (2) of detecting the color change of the thin film caused by the interaction between the thiol-containing compound and the fine particles; and the thin film for use in the method. Thus, thiol-containing compounds such as alkyl mercaptans and thiol-containing proteins can be easily and accurately detected.</p>		

(57)要約

チオール基含有化合物の測定方法であって、下記の工程：(1) 金属及び金属化合物からなる群から選ばれる物質の微粒子と親水性バインダーとを含む薄膜にチオール基含有化合物を含む試料を接触させる工程；及び(2) チオール基含有化合物と上記微粒子との相互作用により生じた該薄膜上の色の変化を検出する工程を含む方法、並びに該方法に用いる薄膜。アルキルメルカプタンやチオール基を含む蛋白質などのチオール基含有化合物を簡便かつ正確に測定することができる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LJ	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサウ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HR	クロアチア			TR	トルコ
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CH	スイス	IE	アイルランド	MR	モリタニア	UG	ウガンダ
CI	コートジボワール	IL	イスラエル	MW	マラウイ	US	米国
CM	カメルーン	IN	インド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	YU	ユーゴスラビア
CU	キューバ	JP	日本	NO	ノールウェー	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュー・ジーランド	ZW	ジンバブエ
CZ	チェッコ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KR	韓国	RO	ルーマニア		

明 細 書

チオール基含有化合物の測定方法

技術分野

本発明は、チオール基含有化合物の簡便な測定方法及び該方法に用いる薄膜に関するものである。

背景技術

チオール基含有化合物は、チオール基の反応性に由来して各種の機能を持つことから化学工業において利用されており、また生体内においてグルタチオンや補酵素Aなど重要な役割を担っている。従来、微量のチオール基含有化合物の検出および定量にはガスクロマトグラフィーや液体クロマトグラフィーなどの分離分析手段を用いて直接測定する方法、マレイミド誘導体などチオール基と反応する化合物を反応させ、蛍光色素などの検出容易な化合物を結合させた後に検出する方法が利用されている。しかしながら、これらの方法には大がかりな装置が必要であり、操作に熟練を要するなどの問題がある。このため、化学実験室、測定室、医療の現場などで試料中に含まれるチオール基含有化合物を簡便かつ正確に測定する方法の開発が求められている。

発明の開示

本発明の課題は、チオール基含有化合物を簡便かつ正確に測定する方法を提供することにある。より具体的には、アルキルメルカプタン、アリールメルカプタン、システインやグルタチオンなどのアミノ酸誘導体、又は遊離形態のチオール基を含む蛋白質などのチオール基含有化合物を簡便かつ正確に測定する方法を提供することが本発明の課題である。また、本発明の別の課題は、上記の特徴を有するチオール基含有化合物の測定方法であって、被検組織内に局在する癌細胞な

どに由来する該化合物の組織内局在を正確に測定する方法を提供することにある。さらに本発明の別の課題は、上記のチオール基含有化合物の測定に用いる薄膜を提供することにある。

本発明者らは上記の課題を解決すべく研究を行った結果、金属及び金属化合物からなる群から選ばれる物質の微粒子と親水性バインダーとを含む薄膜にチオール基含有化合物を含む溶液又は生体組織切片などを密着させると、溶液や組織切片に含まれるチオール基含有化合物と金属及び金属化合物からなる群から選ばれる物質との間に相互作用が生じて薄膜上に色調の変化や着色などの色の変化が生じること、並びに、この色の変化を例えば目視、光学顕微鏡あるいは分光学的な手段で検出することによって、試料中のチオール基含有化合物を簡便かつ正確に測定できることを見出した。また、本発明者らは、上記の薄膜に架橋剤を配合することによって、さらに上記薄膜の検出性能を高めることができることを見出した。本発明はこれらの知見を基にして完成されたものである。

すなわち本発明は、チオール基含有化合物の測定方法であって、下記の工程：

- (1) 金属及び金属化合物からなる群から選ばれる物質の微粒子と親水性バインダーとを含む薄膜にチオール基含有化合物を含む試料を接触させる工程；及び
 - (2) チオール基含有化合物と上記微粒子との相互作用により生じた該薄膜上の色の変化を検出する工程
- を含む方法を提供するものである。

下記の発明は、上記の発明に包含される本発明の好ましい態様の例である。

①チオール基含有化合物の測定方法であって、下記の工程：

- (1)チオール基含有化合物を含む溶液を金属及び金属化合物からなる群から選ばれる物質の微粒子と親水性バインダーとを含む薄膜に滴下する工程；
- (2)必要に応じて滴下した溶液を乾燥した後、溶液中のチオール基含有化合物と上記微粒子とを相互作用させる工程；及び
- (3)チオール基含有化合物と上記微粒子との相互作用により生じた該薄膜上の色の変化を検出する工程

を含む方法。上記態様における工程(2)は、通常、薄膜を室温から70℃の間の飽和湿度下に数分間から数時間放置することにより行われる。

②チオール基含有化合物の測定方法であって、下記の工程：

- (1)生体試料の凍結切片を金属及び金属化合物からなる群から選ばれる物質の微粒子、親水性バインダー、並びに架橋剤を含む薄膜に接触させる工程；
- (2)生体試料中のチオール基含有化合物と上記微粒子とを相互作用させる工程；
- (3)チオール基含有化合物と上記微粒子との相互作用により生じた該薄膜上の色の変化を検出する工程

を含む方法。上記態様における工程(2)は、通常、切片を貼付した薄膜を室温から70℃の間の飽和湿度下に数分間から数時間放置することにより行われる。

③チオール基含有化合物の測定方法であって、下記の工程：

- (1)チオール基含有化合物を含む溶液を吸収性媒体に吸収させる工程；
- (2)該溶液を吸収した上記媒体を金属及び金属化合物からなる群から選ばれる物質の微粒子と親水性バインダーとを含む薄膜に接触させる工程；
- (3)溶液に含まれるチオール基含有化合物と上記微粒子とを相互作用させる工程；及び
- (4)チオール基含有化合物と上記微粒子との相互作用により生じた該薄膜上の色の変化を検出する工程

を含む方法。上記態様において、工程(1)において用いられる吸収性媒体としては、例えば、紙、マイクロフィルター、ゼラチン膜などを挙げることができ、工程(3)は、通常、該薄膜を室温から70℃の飽和湿度下に数分間から数時間放置することにより行われる。

上記各発明の好ましい態様として、チオール基含有化合物がアルキルチオール類、アリールチオール類、アミノ酸又はその誘導体、ペプチド化合物、又は蛋白質である上記の各方法が提供される。また、好ましい態様として、生体試料がヒトを含む哺乳類から分離・採取された試料、より好ましくは、血液、血漿、血清、癌組織切片、歯肉溝滲出液、破壊性病変組織切片、又は破壊性病変組織抽出液（例

例えば、リウマチ性病変組織抽出液又は歯槽膿漏組織抽出液）である上記の各方法が提供される。さらに、金属又は金属化合物を構成する金属が、元素周期表の第2周期、第3周期、第4周期、第5周期、及び第6周期からなる群から選ばれる金属である上記各方法；金属又は金属化合物を構成する金属が元素周期表の第VIb族、第VIIb族、第VIII族、第Ib族、第IIb族、第VIa族、及び第VIIa族からなる群から選ばれる金属である上記各方法が提供される。

別の観点からは、本発明により、金属及び金属化合物からなる群から選ばれる物質と親水性コロイドとを含み、チオール基含有化合物測定に用いるための薄膜が提供される。この発明の好ましい態様によれば、さらに架橋剤を含む薄膜が提供される。この薄膜は、チオール基含有化合物と金属及び金属化合物からなる群から選ばれる物質との相互作用により色の変化を生じることを特徴としている。その好ましい態様として、上記の①ないし③の各方法において定義されたチオール基含有化合物測定用の薄膜が提供される。これらの薄膜のさらに好ましい態様によれば、支持体平面上、例えばスライドガラス又はポリエチレンテレフタレートフィルム上に形成された上記の各薄膜；及び、薄膜と支持体との間に下塗り層が設けられた上記の各薄膜が提供される。

発明を実施するための最良の形態

上記各態様のチオール基含有化合物の測定方法は、基本的には測定の対象となるチオール基含有化合物を含む試料を、金属及び金属化合物からなる群から選ばれる物質の微粒子と親水性バインダーとを含む薄膜と接触させる工程（第一工程）、及び、チオール基含有化合物と金属及び金属化合物からなる群から選ばれる物質の微粒子との相互作用により薄膜表面に形成される表面変化を検出する工程（第二工程）を含んでいる。本発明の方法は、組織切片や滲出液などの生体試料を用いて簡便に測定を行えるという特徴があり、また、検出精度が高く、光学顕微鏡や通常の分光学的手段によっても高感度にチオール基含有化合物を測定できるという特徴がある。チオール基含有化合物の種類は特に限定されず、1個又は2

個以上のチオール基を有する化合物であればいかなるものでもよい。例えば、アルキルチオール類（例えば、メチルメルカプタン、エチルメルカプタンなど）、アリールチオール類（例えば、チオフェノール、チオナフタレン、ベンジルメルカプタンなど）、アミノ酸又はその誘導体（例えば、システイン、グルタチオンなど）、ペプチド化合物（例えば、システイン残基を含むジペプチド化合物、トリペプチド化合物、テトラペプチド化合物、5以上のアミノ酸残基を含むオリゴペプチド化合物など）、又は蛋白質（例えば、システイン残基が表面に配置された球状蛋白質など）などを挙げることができるが、これらに限定されることはない。

本明細書において用いられる「測定」という用語は、定性及び定量を含めて、チオール基含有化合物の存在に関する情報を提供できるものをすべて包含するように最も広義に解釈されるべきである。本発明の方法に従って測定を行うと、試料中にチオール基含有化合物が含まれている場合には、該化合物と薄膜に含まれる金属及び金属化合物からなる群から選ばれる物質の微粒子との間に相互作用が生じ、薄膜上に検出可能な色の変化が惹起される。本明細書において用いられる「相互作用」という用語は、チオール基含有化合物と金属及び金属化合物からなる群から選ばれる物質のコロイドとの間で生じる種々の物理化学的及び／又は化学的な相互作用を包含しており、例えば、錯体や塩の形成、吸着、化学結合などを含めて最も広義に解釈する必要がある。また、上記の相互作用には、酵素作用により生じる物質、例えばプロテアーゼの作用により生じる基質分解物と金属及び金属化合物からなる群から選ばれる物質との間の相互作用も含まれる。

薄膜上に惹起される色の変化はいかなる種類のものでもよく、例えば、着色、脱色、色調変化などを挙げることができる。紫外線や近赤外線領域で観察できるスペクトル変化であってもよい。このような色の変化は1種又は2種以上の組み合わせであってもよい。例えば、紫外光、可視光の反射又は透過での吸光度測定、顕微鏡下または肉眼での測定など、当業者に利用可能な種々の測定方法のいずれか、またはこれらの測定方法の2種以上の組み合わせによって検出可能な色の変化であればよい。

金属及び金属化合物からなる群から選ばれる物質のうち、金属化合物としては無機金属化合物又は有機金属化合物のいずれを用いてもよい。金属化合物としては、例えば、酸化物、塩化物、臭化物、有機化合物を配位子とする錯体などを挙げることができる。例えば、金属又は金属化合物を構成する金属が、長周期型元素周期表の第2周期、第3周期、第4周期、第5周期、及び第6周期からなる群から選ばれる金属であり、及び／又は元素周期表の第VIb族、第VIIb族、第VIII族、第Ib族、第IIb族、第VIa族、及び第VIIa族からなる群から選ばれる金属であることが好ましい。これらのうち、第4周期、第5周期、又は第6周期で、かつ第VIII族又は第Ib族の金属がさらに好ましく、金、銀、銅、白金、パラジウムが最も好ましい。これらの金属のなかでも金、銀、白金が特に好ましく、銀が最も好ましい。金属及び金属化合物からなる群から選ばれる物質の微粒子を2種以上組み合わせて用いてもよい。2種以上の物質を用いる場合には混合物を用いることができるが、合金として用いることも可能である。

より具体的には、金属及び金属化合物からなる群から選ばれる物質として、オスミウム、酸化オスミウム；銀（平均粒径 0.01 μm 、0.03 μm 、0.05 μm ）、酸化銀、塩化銀、臭化銀、ヨウ化銀、酢酸銀、アルギン酸銀、ベヘン酸銀；金、塩化金；コバルト、酸化コバルト、塩化コバルト；鉄、酸化鉄、塩化鉄；白金、酸化白金、塩化白金；パラジウム、酸化パラジウム、塩化パラジウム；ルテニウム、酸化ルテニウム、塩化ルテニウム；及び、ロジウム、酸化ロジウム、塩化ロジウムからなる群から選ばれる1種又は2種以上の物質を好ましい例として挙げることができる。

金属及び金属化合物からなる群から選ばれる物質の微粒子は薄膜中に存在していればよく、存在状態は特に限定されないが、例えば実質的に球形の微粒子状態で均一分散されていることが好ましい。微粒子の粒径は特に限定されないが、例えば、平均粒径 0.001 μm 以上、1 μm 以下、より好ましくは平均粒径 0.1 μm 以下、特に好ましくは 0.03 μm 以下である。

親水性バインダーとしては、水に溶解し、又は水を吸収して膨潤する性質を有

するものであればいかなるものを用いてもよい。例えば、天然高分子として、ゼラチン、コラーゲン、カゼイン、トランスフェリン、カルボキシメチルトランスフェリン、フィブロンネクチン、ラミニン、エラスチンなどのタンパク質及びタンパク質由来の物質；セルロース、アセチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、デンプン、アガロース、カラギーナン、デキストラン、デキストリン、キチン、キトサン、ペクチン、マンナンなどの多糖類及び多糖類由来の物質；ポバール、ポリアクリルアミド、ポリアクリル酸、ポリビニルピロリドン、ポリエチレングリコール、ポリスチレンスルホン酸、ポリアリーールアミンなどの合成高分子およびこれらのモノマーを含むコポリマー、またはこれらに由来するゲルなどを用いることができるが、これらに限定されることはない。

本発明の薄膜の製造に用いられる架橋剤は、例えば、薄膜の硬化を促進し、及び／又は形成後の薄膜の膨潤を防止する作用を有しているものから選択すればよい。架橋剤の種類は、上記の作用を有し、かつチオール基含有化合物と金属及び金属化合物からなる群から選ばれる物質との相互作用に対して実質的に影響を及ぼさない限り特に限定されず、無機又は有機の架橋剤のいずれを用いてもよい。例えば、クロム塩（クロム明ばん、酢酸クロムなど）；カルシウム塩（水酸化カルシウム、塩化カルシウムなど）；アルミニウム塩（水酸化アルミニウム、塩化アルミニウムなど）；アルデヒド類（ホルムアルデヒド、グリオキサール、グルタルアルデヒドなど）；N-メチロール化合物（ジメチロール尿素、メチロールジメチルヒダントインなど）；ジオキサン誘導体（2,3-ジヒドロキシジオキサンなど）、カルボキシル基を活性化することにより作用する化合物類（カルベニウム 2-ナフタレンスルホナート-1,1-ビスピロリジノ-1-クロロ、ピリジニウム 1-モルホリノカルボニル-3-(スルホナトアミノメチル) など）；活性ビニル化合物（1,3-ビスビニルスルホニル-2-プロパノール、1,2-ビス（ビニルスルホニルアセトアミド）エタン、ビス（ビニルスルホニルメチル）エーテル、ビニルスルホニル基を側鎖に有するビニル系ポリマー、1,3,5-トリアクリロイル-ヘキサヒドロ-s-トリアジン、ビス（ビニルスルホニル）メタンなど）；活性ハロゲン化合物（2,4-ジクロロ

-6-ヒドロキシ-s-トリアジン及びそのナトリウム塩など); ムコハロゲン酸類 (ムコクロル酸、ムコフェノキシクロル酸など); イソオキサゾール類; ジアルデヒド澱粉; 又は、2-クロル-6-ヒドロキシトリアジニル化ゼラチンなどの架橋剤を単独でまたは2種以上を組み合わせて用いることができる。これらのうち、活性ビニル系架橋剤が好ましい。架橋剤の使用量は特に限定されないが、例えば、親水性バインダー 100 g に対して 0.1~20 mmol、さらに好ましくは 0.3~10 mmol 程度を配合するのがよい。

本発明の方法に用いる試料は特に限定されないが、例えば、化学合成および化学分析でチオール基含有化合物を測定したい試料、ヒトを含む哺乳類動物から分離・採取した生体試料などを対象とすることができる。生体試料としては、例えば血液、血漿、血清、組織、又は組織滲出液などを用いることができる。より具体的には、血液、血漿、血清などの血液由来試料および肺癌、胃癌、食道癌、乳癌、脳腫瘍などの固形癌組織から手術や組織検査などにより分離・採取した癌組織、リウマチ性関節炎の滑膜や骨組織、及び歯槽膿漏の歯根膜や骨組織などの破壊性病変組織や滲出液、並びに歯周病の歯肉溝滲出液などを用いることができる。

試料が生体組織の場合には、例えば、液体窒素で急速凍結した試料から凍結切片作成装置を用いて厚さ 1~10 μm 、好ましくは 5 μm 程度の切片を調製し、この切片を薄膜に貼付することによって試料と薄膜とを接触させることができる。また、血漿やリウマチ性関節炎の患者から採取した滑膜液を試料として用いる場合には、約1~30 μl 、好ましくは5~10 μl 程度を薄膜上に滴下すればよい。歯周病の歯肉溝滲出液を試料として用いる場合には、歯肉溝内に濾紙を挿入して約5~10 μl 程度の歯肉溝滲出液を採取し、該濾紙を薄膜に貼付する方法を採用することができる。歯肉溝滲出液の採取後、必要に応じて蒸留水や適宜の緩衝液 (例えば50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM CaCl_2 , 0.2 M NaCl など) を用いて濾紙から歯肉溝滲出液を抽出し、抽出液を薄膜上に滴下してもよい。

本発明の薄膜は支持体平面状に形成されることが好ましい。支持体の材質や形状は特に限定されないが、薄膜上の色の変化を顕微鏡下で観察するような場合や、

吸光度測定や蛍光測定などの分光学的手段により表面変化を検出する場合には、例えば、薄膜は透明又は半透明の支持体上に形成されることが好ましい。このような透明又は半透明の支持体としては、例えば、ガラス、又はポリエチレンテレフタレート、ポリカーボネート、ポリイミド、ナイロン、セルロース、若しくはセルローストリアセテート等からなる透明又は半透明プラスチックフィルムなどを用いることができる。ガラスとしては顕微鏡用のスライドガラスを用いることが好ましく、プラスチックフィルムとしてはポリエチレンテレフタレートフィルムを用いることが好ましい。

また、上記の支持体に加えて、不透明な支持体を用いることも可能である。例えば、紙、合成紙、合成樹脂（例えば、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリエチレンナフタレート等）をラミネートした紙、金属板（例えば、アルミニウム、アルミニウム合金、亜鉛、鉄、銅などの板）、上記の金属がラミネート又は蒸着された紙やプラスチックフィルムなどを用いることができる。このような態様においては支持体に着色が施されていてもよい。もっとも、支持体は上記に例示したものに限定されることはなく、均一な薄膜を製造することができるものであればいかなるものを用いてもよい。

支持体の厚さは特に限定されないが、ガラスの場合にはスライドガラス程度の厚さのもの（例えば 2~3 mm 程度）が好ましく、ポリエチレンテレフタレートフィルムの場合には約 100~250 μm 、より好ましくは約 150~200 μm 、特に好ましくは 175 μm 程度のものを用いることができる。該支持体上の薄膜は単層又は重層で形成することができるが、薄膜はできる限り均一な膜厚を与えるように調製すべきである。例えば、乾燥後の膜厚が 0.2~10 μm 、好ましくは 0.5~6 μm 程度になるように調製することが好ましい。

薄膜の調製には、例えば、水、又はメチレンクロライド、アセトン、メタノール、エタノール、若しくはそれらの混合溶媒などの有機溶媒に金属及び金属化合物からなる群から選ばれる物質の微粒子、親水性バインダー、及び必要に応じて架橋剤の所定量を加えて均一に分散させ、得られた分散液を支持体表面に塗布し

て乾燥すればよい。塗布方法としては、例えば、ディップ塗布法、ローラー塗布法、カーテン塗布法、押し出し塗布法などを採用することができる。もっとも、薄膜の調製方法はこれらに限定されることはなく、例えば、写真用フィルムの技術分野などにおいて汎用されている薄膜形成方法などを適宜採用することが可能である。

金属及び金属化合物からなる群から選ばれる物質としてコロイド銀を用いる場合について説明すると、例えば、ハロゲン化銀カラー写真感光材料の分野において、コロイド銀は通常イエローフィルター用としての黄色コロイド銀とアンチハレーション用の黒色コロイド銀が一般的に用いられているので、本発明にはこれらのコロイド銀を用いることができる。また、これらに加えて、橙褐色や褐灰色のコロイド銀であってもよい。これらのうち、最大吸収波長が400 nm から500 nm の黄色のコロイド銀を用いることが特に好ましい。

その調製方法としては、従来から知られている方法、例えば、米国特許第2,688,601号明細書に開示されたゼラチン溶液中で可溶性銀塩をハイドロキノンによって還元する方法、ドイツ特許第1,096,193号明細書に記載されている難溶性銀塩をヒドラジンによって還元する方法、米国特許第2,921,914号明細書に記載されているようにタンニン酸により銀に還元する方法、特開平5-134358号公報に記載されているように無電解メッキによって銀粒子を形成する方法などを用いることができる。また、Wiley & Sons, New York, 1933年発行、Weiser著のColloidal Elementsに記載されたCarey Leのデキストリン還元法による黄色コロイド銀の調製方法を用いてもよい。

薄膜を支持体上に形成するにあたり、薄膜と支持体との接着を改善するために、薄膜と支持体表面との間に下塗り層を設けてもよい。例えば、塩化ビニル、塩化ビニリデン、ブタジエン、メタクリル酸、アクリル酸、イタコン酸、無水マレイン酸等から選ばれるモノマーの1種又は2種以上を重合させて得られる重合体又は共重合体、ポリエチレンイミン、エポキシ樹脂、グラフト化ゼラチン、又はニトロセルロースなどの重合体を下塗り層として形成することができる。また、ポ

リエステル系支持体を用いる場合には、下塗り層に替えて、支持体表面をコロナ放電処理、紫外線処理、又はグロー放電処理することによっても、支持体と薄膜との接着力を改善できる場合がある。

本明細書において用いられる「支持体表面上に形成された薄膜」という用語またはその同義語については、このような1又は2以上の下塗り層及び／又は支持体表面の処理を排除するものと解釈してはならない。もっとも、薄膜と支持体との接着を改善するための手段は上記のものに限定されることはなく、例えば、写真用フィルムの技術分野などにおいて汎用されている手段を適宜採用することができる。また、上記のように薄膜が複数の層を積層してなる場合には、積層される2つの層の間にさらに中間層を設けてもよく、本明細書において用いられる「積層」という用語は、2つの層が直接接触している場合に限定して解釈してはならない。このような中間層を適宜配置する手段は、例えば、写真用フィルムの技術分野などにおいて汎用されている。

薄膜を製造する際に、上記の成分に加えて、染料、顔料、防腐剤、安定化剤などの成分を適宜配合してもよい。このような成分は、チオール基含有化合物と金属及び金属化合物からなる群から選ばれる物質との相互作用に実質的に影響を与えないものであれば特に限定されず、適宜のものを選択して用いることが可能である。

本発明の方法の実施の形態は特に限定されないが、例えば、液体試料を薄膜上に滴下するか、あるいは組織切片を薄膜に貼付することによって薄膜と試料とを接触させ、必要に応じて薄膜上の液滴を乾燥させた後、好ましくは湿潤箱内で、例えば37°Cで6時間以内、好ましくは1時間以内、さらに好ましくは5分～30分程度、または室温で6時間以内、好ましくは1時間以内、さらに好ましくは5分～30分程度インキュベートすればよい。

試料中にチオール基含有化合物が含まれる場合には、薄膜内の金属及び金属化合物からなる群から選ばれる物質の微粒子と該化合物との間で相互作用が生じ、着色、脱色、色調変化などの色の変化が惹起される。色の変化は肉眼又は顕微鏡

下で観察するか、吸光度測定、蛍光測定などの分光学的測定など適宜の手段により検出することができる。

本発明の方法の別の態様に従えば、癌組織などから連続凍結切片を作成し、実質的に連続した二切片のうち的一方の切片を、例えば、ヘマトキシリン・エオシン染色などの通常の組織標本として調製し、他の切片を本発明の測定方法に従って処理し、両者の観察結果を比較・対比することによって組織中の個々の細胞に由来するチオール基含有化合物の局在を正確に把握することが可能である。また、一枚の組織切片中のチオール基含有化合物の局在を検出すると同時に細胞の核形態などを観察したい場合には、本発明の測定方法に従って処理し、薄膜内の金属及び金属化合物からなる群から選ばれる物質の微粒子とチオール基含有化合物との間で相互作用が生じて色の変化が惹起された後、例えばヘマトキシリンによる核染色を行うとよい。この方法により、個々の細胞に由来するチオール基含有化合物の局在をより正確に把握することが可能である。

実施例

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例に限定されることはない。

例1：チオール基含有化合物測定用薄膜の製造

(a) 単層薄膜：試料101の製造

豚皮酸処理ゼラチン 15 g を純水 122 g に溶解し、コロイド銀を添加した後、架橋剤として1,2-ビス（ビニルスルホニルアセトアミド）エタン(4%)を 0.6 ml 添加した。この溶液をスライドガラス上に乾燥膜厚が約7 μ m になるように均一にワイヤーバーコーターを使って塗布し、乾燥して薄膜とした。薄膜は使用時まで室温で保存した。黄色のコロイド銀は、pHを11.0に調整したデキストリンを18 g 含む水溶液 700 ml に硝酸銀 17 g を含む水溶液を添加し、ゼラチンを添加して30°Cで公知のフローキュレーション法により水洗し、さらにゼラチンを加えて60°Cに加熱することにより製造した。なお、塗布の際には必要に応じて塗布助剤を使用

した。

(b) 単層薄膜：試料 102～125 の製造

金属及び金属化合物からなる群から選ばれる物質、親水性コロイド、硬膜剤、支持体を表 1 及び表 2 のように変更および追加して、試料101と同様にして試料102～125 を作成した。

(c) 単層薄膜：試料 126～129 の製造

塗布の際にワイヤーバーコーターの代わりにスライドコーターを使用した他は試料 122～125 と同様にして試料 126～129 を作成した。なお、乾燥条件は、必要に応じて10℃にいったん冷却した後、常温常湿で乾燥する方法を採用した。

表 1

試料番号	金属及び/または金属化合物			親水性バインダー		架橋剤		支持体	
	内容	平均粒径	塗布量	内容	膜厚	内容	塗布量	内容	内容
101	コロイド銀 (写真用: 110-7114ター)	0.01mm	0.04g/m ²	豚皮酸処理ゼラチン	7.0μm	1,2-ビス (ビニル	0.60g/m ²	スライドガラス	
102	コロイド銀 (写真用: 110-7114ター)	0.01mm	0.37g/m ²	豚皮酸処理ゼラチン	7.0μm	スルホニルアセト	0.60g/m ²		
103	コロイド銀 (写真用: 710114ター)	0.05mm	0.37g/m ²	豚皮酸処理ゼラチン	7.0μm	アミド) エタン	0.60g/m ²		
104	塩化銀 (写真用)	0.05mm	0.37g/m ²	豚皮酸処理ゼラチン	7.0μm		0.60g/m ²		
105	臭化銀 (写真用)	0.05mm	0.37g/m ²	豚皮酸処理ゼラチン	7.0μm		0.60g/m ²		
106	臭化銀 (写真用)	0.09mm	0.37g/m ²	豚皮酸処理ゼラチン	7.0μm		0.60g/m ²		
107	臭化銀 (写真用)	0.50mm	0.37g/m ²	豚皮酸処理ゼラチン	7.0μm		0.60g/m ²		
108	臭化銀 (写真用)	1.00mm	0.37g/m ²	豚皮酸処理ゼラチン	7.0μm		0.60g/m ²		
109	ヨウ化銀 (写真用)	1.00mm	0.37g/m ²	豚皮酸処理ゼラチン	7.0μm		0.60g/m ²		
110	コロイド金	0.01mm	0.37g/m ²	豚皮酸処理ゼラチン	7.0μm		0.60g/m ²		
111	コロイド金	0.01mm	0.37g/m ²	豚皮酸処理ゼラチン	3.0μm		0.60g/m ²		
112	コロイド金	0.03mm	0.37g/m ²	豚皮酸処理ゼラチン	1.0μm		0.60g/m ²		
113	コロイド銀 (写真用: 110-7114ター)	0.01mm	0.37g/m ²	牛骨7114ター処理ゼラチン	7.0μm		0.60g/m ²		
114	コロイド銀 (写真用: 110-7114ター)	0.01mm	0.37g/m ²	牛骨酸処理ゼラチン	7.0μm		0.60g/m ²		
115	コロイド銀 (写真用: 110-7114ター)	0.01mm	0.37g/m ²	カゼイン	7.0μm		0.60g/m ²		
116	コロイド銀 (写真用: 110-7114ター)	0.01mm	0.37g/m ²	ポリビニルアルコール	7.0μm	デカールEX810	0.60g/m ²		
117	コロイド銀 (写真用: 110-7114ター)	0.01mm	0.37g/m ²	豚皮酸処理ゼラチン	7.0μm	1,2-ビス (ビニル	2.40g/m ²	PET フィルム	
118	コロイド銀 (写真用: 110-7114ター)	0.01mm	0.18g/m ²	豚皮酸処理ゼラチン	7.0μm	スルホニルアセト	2.40g/m ²	PET フィルム	
119	コロイド銀 (写真用: 110-7114ター)	0.01mm	0.18g/m ²	豚皮酸処理ゼラチン	5.0μm	アミド) エタン	1.70 g/m ²	PET フィルム	
120	コロイド銀 (写真用: 110-7114ター)	0.01mm	0.18g/m ²	豚皮酸処理ゼラチン	3.0μm	↓	1.00 g/m ²	PET フィルム	

表 2

試料番号	金属及び/または金属化合物			親水性バインダー		架橋剤		支持体
	内容	平均粒径	塗布量	内容	膜厚	内容	塗布量	
121	コロイド銀 (写真用: 110-7111ター)	0.01mm	0.18g/m ²	豚皮酸処理ゼラチン	1.0μm	1,2-ビス (ビニル	0.34g/m ²	PET フィルム
122	コロイド銀 (写真用: 110-7111ター)	0.01mm	0.18g/m ²	豚皮酸処理ゼラチン	0.5μm	スルホニルアセト	0.17g/m ²	PET フィルム
123	コロイド銀 (写真用: 110-7111ター)	0.01mm	0.18g/m ²	豚皮酸処理ゼラチン	1.0μm	アミド) エタン	0.34g/m ²	PEN フィルム
124	コロイド銀 (写真用: 110-7111ター)	0.01mm	0.18g/m ²	豚皮酸処理ゼラチン	1.0μm		0.34g/m ²	アセチルセルロース膜
125	コロイド銀 (写真用: 110-7111ター)	0.01mm	0.18g/m ²	豚皮酸処理ゼラチン	1.0μm		0.34g/m ²	PE フォトリソグレイ紙
126	コロイド銀 (写真用: 110-7111ター)	0.01mm	0.18g/m ²	豚皮酸処理ゼラチン	0.5μm		0.17g/m ²	PET フィルム
127	コロイド銀 (写真用: 110-7111ター)	0.01mm	0.18g/m ²	豚皮酸処理ゼラチン	1.0μm		0.34g/m ²	PEN フィルム
128	コロイド銀 (写真用: 110-7111ター)	0.01mm	0.18g/m ²	豚皮酸処理ゼラチン	1.0μm		0.34g/m ²	アセチルセルロース膜
129	コロイド銀 (写真用: 110-7111ター)	0.01mm	0.18g/m ²	豚皮酸処理ゼラチン	1.0μm	→	0.34g/m ²	PE フォトリソグレイ紙

例 2 : 薄膜を用いたチオール基含有化合物測定

(a) 溶液試料の測定

チオール基含有化合物測定液体試料として、グルタチオンをそれぞれ0.1m mol/L から 1m mol/Lの濃度で含む溶液を用いた。例 1 で得たそれぞれの薄膜上に液体試料約10 μ l を滴下した。薄膜を湿潤箱内に入れて37°Cで 1時間インキュベートした後、それぞれの試料に対して目視による判定を行った。結果を表 3 に示す (表中、色の変化の程度を下記の記号で表した。*:わずかに有り; **:弱く有り; ***:有り; ****:明瞭に有り; *****:極めて強い)。いずれのサンプルについても視認性のある色の変化が現れた。特に、コロイド銀含有薄膜は強い赤色の着色を与えた。

表 3

試料番号	色の変化の有無	試料番号	色の変化の有無
101	*	116	***
102	****	117	***
103	**	118	***
104	**	119	***
105	**	120	***
106	**	121	****
107	*	122	*****
108	*	123	****
109	*	124	****
110	**	125	****
111	***	126	*****
112	****	127	****
113	****	128	****
114	****	129	****
115	****		

(b) 生体組織の凍結切片試料の測定

生体試料として、ICRマウスから摘出した肝臓および脾臓を約 5 μ m厚さの凍結切

片として試料番号 120～122 の薄膜表面に貼付した。薄膜を湿潤箱内に入れて 37℃で 30 分間インキュベートした。活性の評価方法としては、それぞれの試料に対して、①目視による判定、及び②光学顕微鏡による微小部分の判定を行った。その結果、脾臓切片を張り付けた場合に比べ、肝臓切片を張り付けた場合に明かに強い発色を示した。また、この肝臓および脾臓試料に含まれるグルタチオンの量を、別途、高速液体クロマトグラフィーにより定量したところ、肝臓は 9 mmol/kg、脾臓は 1 mmol/kg と肝臓で高値を示し、本発明の薄膜による測定と良い対応を示した。

(c) 癌組織の測定

被検組織試料として、乳癌の凍結手術標本から厚さ 5 μ m の連続切片を作成し、一枚をスライドガラスに張り付けて乾燥させた後、常法に従ってヘマトキシリン・エオシン染色を行った。他の連続切片を例 1 で製造した試料番号 120～122 のゼラチン薄膜上に貼付し、湿潤箱に入れて 37 °C で 30 分間インキュベートした。インキュベート終了後に薄膜は色の変化を与えており、一方、他の部分は元の色のままであった。いずれの癌組織にも、特に癌胞巣辺縁に位置する細胞に強い色の変化が認められた。なお、ヘマトキシリン、エオシン染色で癌細胞と診断される部分については本発明の薄膜でまったく同じ位置に色の変化が認められた。

例 3：薄膜を用いたチオール基を含まない化合物の測定（比較例）

チオール基を含まない化合物の測定液体試料として、グリシン、ヒスチジン、メチオニン、シスチン、メチルエチルケトン、抱水クロラルをそれぞれ 0.1 mmol/L から 1 mmol/L の濃度で含む水またはエタノール溶液を用いた。例 1 で得た No. 117～122 の薄膜上に各々液体試料約 10 μ l を滴下した。薄膜を湿潤箱内に入れて 37℃で 30 分間インキュベートした後、それぞれの試料に対して目視による判定を行った。その結果、いずれも有意な色の変化を起こさなかった。

産業上の利用可能性

本発明の方法によれば、溶液中や生体組織中に存在するチオール基含有化合物

を正確かつ簡便に測定することができ、しかも短時間に判定結果を入手できる。
また、本発明の方法によれば、極めて微量の試料からチオール基含有化合物を測定することが可能であり、組織内の個々の細胞中に局在するチオール基含有化合物を測定し、測定後の薄膜を標本として長期間保存することもできる。

請 求 の 範 囲

1. チオール基含有化合物の測定方法であって、下記の工程：

- (1) 金属及び金属化合物からなる群から選ばれる物質の微粒子と親水性バインダーを含む薄膜にチオール基含有化合物を含む試料を接触させる工程；及び
- (2) チオール基含有化合物と上記微粒子との相互作用により生じた該薄膜上の色の変化を検出する工程を含む方法。

2. チオール基含有化合物の測定方法であって、下記の工程：

- (1) 金属及び金属化合物からなる群から選ばれる物質の微粒子、親水性バインダー、並びに架橋剤を含む薄膜にチオール基含有化合物を含む試料を接触させる工程；及び
- (2) チオール基含有化合物と上記微粒子との相互作用により生じた該薄膜上の色の変化を検出する工程を含む方法。

3. 金属又は金属化合物を構成する金属が元素周期表の第2周期、第3周期、第4周期、第5周期、及び第6周期からなる群から選ばれる金属である請求の範囲第1項又は第2項に記載の方法。

4. 金属又は金属化合物を構成する金属が元素周期表の第VIb族、第VIIb族、第VIII族、第Ib族、第IIb族、第VIa族、及び第VIIa族からなる群から選ばれる金属である請求の範囲第1項ないし第3項のいずれか1項に記載の方法。

5. 金属又は金属化合物を構成する金属が金、銀、銅、及び白金からなる群から選ばれる金属である請求の範囲第3項に記載の方法。

6. 該チオール基含有化合物がアルキルメルカプタン類、アリールメルカプタン類、アミノ酸及びその誘導体、ペプチド化合物、並びに蛋白質からなる群から選ばれる化合物である請求の範囲第1項ないし第5項のいずれか1項に記載の方法。

7. チオール基を含む試料がヒトを含む哺乳類から分離・採取された生体試料である請求の範囲第1項ないし第6項のいずれか1項に記載の方法。
8. 生体試料が癌組織切片である請求の範囲第7項に記載の方法。
9. 金属及び金属化合物からなる群から選ばれる物質の微粒子と親水性バインダーとを含み、チオール基含有化合物測定用に用いる薄膜。
10. さらに架橋剤を含む請求の範囲第9項に記載の薄膜。
11. チオール基含有化合物と上記微粒子との相互作用により色の変化を生じる請求の範囲第9項又は第10項に記載の薄膜。
12. 請求の範囲第1項ないし第8項のいずれか1項に記載の方法に使用するための薄膜。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/04933

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ G01N31/00, G01N21/75, G01N33/68, G01N33/52

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ G01N31/00, G01N21/75, G01N33/68, G01N33/52

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-1999
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-1999	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-1999

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JICST

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP, 6-16619, A (TERUMO CORORATION), 25 January, 1994 (25.01.94) (Family: none)	1-12
X Y	JP, 63-247656, A (Miles Inc.), 14 October, 1988 (14.10.88) & FR, 261049, A & DE, 3703081, A & GB, 2200989, A & CA, 1339797, A	1-4, 6-12 5
X Y	JP, 5-130897, A (TERUMO CORORATION), 28 May, 1993 (28.05.93) (Family: none)	1-4, 6-12 5
A	JP, 62-228947, A (Fuji Photo Film Co., Ltd.), 07 October, 1987 (07.10.87) (Family: none)	1-12
A	JP, 10-84991, A (KDK CORPORATION), 07 April, 1998 (07.04.98) (Family: none)	1-12



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* "A"

Special categories of cited documents:
document defining the general state of the art which is not
considered to be of particular relevance

"E"

earlier document but published on or after the international filing
date

"L"

document which may throw doubts on priority claim(s) or which is
cited to establish the publication date of another citation or other
special reason (as specified)

"O"

document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other
means

"P"

document published prior to the international filing date but later
than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or
priority date and not in conflict with the application but cited to
understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered novel or cannot be considered to involve an inventive
step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered to involve an inventive step when the document is
combined with one or more other such documents, such
combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

07 December, 1999 (07.12.99)

Date of mailing of the international search report

18 January, 2000 (18.01.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 99/04933

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁷ G01N31/00, G01N21/75, G01N33/68, G01N33/52

B. 調査を行った分野
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁷ G01N31/00, G01N21/75, G01N33/68, G01N33/52

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの
日本国実用新案公報 1922-1996年
日本国公開実用新案公報 1971-1999年
日本国登録実用新案公報 1994-1999年
日本国実用新案登録公報 1996-1999年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
J I C S T

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	J P, 6-16619, A (テルモ株式会社) 25. 1月. 1994 (25. 01. 94) (ファミリーなし)	1-12
X	J P, 63-247656, A (マイルス・インコーポレーテッド) 14. 10月. 1988 (14. 10. 88)	1-4 6-12
Y	& F R, 261049, A & D E, 3703081, A & G B, 2200989, A & C A, 1339797, A	5

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 07. 12. 99

国際調査報告の発送日 18.01.00

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
竹中 靖典



2 J 9507

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP, 5-130897, A (テルモ株式会社) 28. 5月. 1993 (28. 05. 93) ファミリーなし	1-4 6-12
Y		5
A	JP, 62-228947, A (富士写真フイルム株式会社) 7. 10月. 1987 (07. 10. 87) ファミリーなし	1-12
A	JP, 10-84991, A (株式会社京都第一科学) 7. 4月. 1998 (07. 04. 98) ファミリーなし	1-12

167

特 許 協 力 条 約

PCT

REC'D 11 AUG 2000

WIPO

PCT


国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
[PCT36条及びPCT規則70]

出願人又は代理人 の書類記号 99312M	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP99/04933	国際出願日 (日.月.年) 10.09.99	優先日 (日.月.年) 10.09.98
国際特許分類(IPC) Int. Cl ⁷ G01N21/75, 31/00, 33/68, 33/52		
出願人(氏名又は名称) 富士写真フイルム株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。
- ☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
- I ☒ 国際予備審査報告の基礎
- II ☐ 優先権
- III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV ☐ 発明の単一性の欠如
- V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI ☐ ある種の引用文献
- VII ☐ 国際出願の不備
- VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 10.09.99	国際予備審査報告を作成した日 06.06.00	
名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 竹中靖典	2J 9507
電話番号 03-3581-1101 内線 3252		

様式PCT/IPEA/409(表紙)(1998年7月)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT 14条)の規定に基づく命令に
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 出願時に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 PCT 19条の規定に基づき補正されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 _____ ページ/図、 出願時に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)

請求の範囲

請求の範囲

1-12

有

無

進歩性(IS)

請求の範囲

請求の範囲

1-12

有

無

産業上の利用可能性(IA)

請求の範囲

請求の範囲

1-12

有

無

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

請求の範囲1-12について

文献1: JP, 6-16619, A (テルモ株式会社) 25. 1月. 1994 (25. 01. 94)

文献2: JP, 63-247656, A (マイルス・インコーポレーテッド) 14. 10月. 1988 (14. 10. 88)

文献3: JP, 5-130897, A (テルモ株式会社) 28. 5月. 1993 (28. 05. 93)

文献4: JP, 62-228947, A (富士写真フイルム株式会社) 7. 10月. 1987 (07. 10. 87)

文献5: JP, 10-84991, A (株式会社京都第一化学) 7. 4月. 1998 (07. 04. 98)

文献1には、チオール基含有化合物の測定方法であって、銅、亜鉛、ニッケル、コバルトなどの金属を含んだ薄膜に、チオール基含有化合物を含む試料を接触させて、その際に生じた該薄膜上の色の変化を検出する方法が記載されている。

文献2には、チオール基含有化合物の測定方法であって、測定試薬に酸化鉄を、文献3には、チオール基含有化合物の測定方法であって、測定試薬としてコバルトを用いた検出方法が記載されている。

また文献4、5に記載されているように、分析用のスライドを作る際に、測定試薬とともに、必要に応じて、架橋剤、親水性バインダーなどを混入することは、当業者が適宜実施しうる事項である。

よって、文献1～3に記載されたチオール基含有化合物の測定方法に、文献4、5に記載されているような架橋剤、親水性バインダーなどを混入することによって、本願発明のような構成とすることは当業者にとって自明である。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

12T
PCT
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 99312M	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP99/04933	International filing date (day/month/year) 10 September 1999 (10.09.99)	Priority date (day/month/year) 10 September 1998 (10.09.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC G01N 21/75, 31/00, 33/68, 33/52		
Applicant FUJI PHOTO FILM CO., LTD.		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>3</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p>	
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>	

Date of submission of the demand 10 September 1999 (10.09.99)	Date of completion of this report 06 June 2000 (06.06.2000)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/04933

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the claims:
pages _____, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**1. Statement**

Novelty (N)	Claims		YES
	Claims	1-12	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-12	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-12	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations**Concerning claims 1-12**

Document 1: JP, 6-16619, A (Terumo Corporation), 25 January, 1994 (25.01.94)

Document 2: JP, 63-247656, A (Miles Inc.), 14 October, 1988 (14.10.88)

Document 3: JP, 5-130897, A (Terumo Corporation), 28 May, 1993 (28.05.93)

Document 4: JP, 62-228947, A (Fuji Photo Film Co., Ltd.), 7 October, 1987 (07.10.87)

Document 5: JP, 10-84991, A (KDK Corporation), 7 April, 1998 (07.04.98)

Document 1 discloses a method for detecting a thiol-group-containing compound in which a sample containing a thiol-group-containing compound is made to come into contact with a thin film that contains a metal such as copper, zinc, nickel or cobalt, and the resulting change in the color of the thin film is detected.

Document 2 discloses a method for detecting a thiol-group-containing compound in which iron oxide is used in the measurement reagent, and document 3 discloses a method for detecting a thiol-group-containing compound in which cobalt is used in the measurement reagent.

Moreover, as can be seen from the disclosures in documents 4 and 5, it is considered that, when preparing a slide to be used in analysis, a person skilled in the art would as required be able to mix in things like a crosslinking agent and a hydrophilic binder along with the measurement reagent.

It is thus considered that, in the case of the methods for detecting thiol-group-containing compounds disclosed in documents 1-3, mixing in things like a crosslinking agent and a hydrophilic binder as disclosed in documents 4 and 5, thus arriving at the constituent features of the inventions of the present application, would be obvious to a person skilled in the art.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

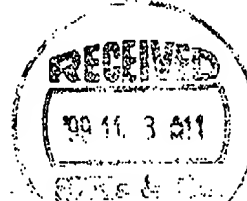
NOTIFICATION CONCERNING SUBMISSION OR TRANSMITTAL OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

IMAMURA, Masazumi
KRF Building, 5th Floor
5-5, Kyobashi 1-chome
Chuo-ku, Tokyo 104-0031
JAPON



Date of mailing (day/month/year) 01 November 1999 (01.11.99)	
Applicant's or agent's file reference 99312M	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/JP99/04933	International filing date (day/month/year) 10 September 1999 (10.09.99)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 10 September 1998 (10.09.98)
Applicant FUJI PHOTO FILM CO., LTD. et al	

1. The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
3. An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
4. The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
10 Sept 1998 (10.09.98)	10/256839	JP	29 Octo 1999 (29.10.99)

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer <div style="text-align: right;"> Carlos Naranjo </div> Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	--



THIS PAGE BLANK (USPTO)

E P

P



国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
〔PCT18条、PCT規則43、44〕

出願人又は代理人 の書類記号 99312M	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 99/04933	国際出願日 (日.月.年) 10.09.99	優先日 (日.月.年) 10.09.98
出願人 (氏名又は名称) 富士写真フイルム株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

- a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。
☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。
- b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。
☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。
☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。
☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、
 第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。 ☒ なし
☐ 出願人は図を示さなかった。
☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

THIS PAGE BLANK (uspro)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁷ G01N31/00, G01N21/75, G01N33/68, G01N33/52

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁷ G01N31/00, G01N21/75, G01N33/68, G01N33/52

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年
日本国公開実用新案公報 1971-1999年
日本国登録実用新案公報 1994-1999年
日本国実用新案登録公報 1996-1999年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
J I C S T

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	J P, 6-16619, A (テルモ株式会社) 25. 1月. 1994 (25. 01. 94) (ファミリーなし)	1-12
X	J P, 63-247656, A (マイルス・インコーポレーテッド) 14. 10月. 1988 (14. 10. 88)	1-4 6-12
Y	& FR, 261049, A & DE, 3703081, A & GB, 2200989, A & CA, 1339797, A	5

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日
07. 12. 99

国際調査報告の発送日
18.01.00

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
竹中 靖典



2 J 9507

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

THIS PAGE BLANK (USPTO)

C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP, 5-130897, A (テルモ株式会社) 28. 5月. 1993 (28. 05. 93) ファミリーなし	1-4 6-12
Y		5
A	JP, 62-228947, A (富士写真フイルム株式会社) 7. 10月. 1987 (07. 10. 87) ファミリーなし	1-12
A	JP, 10-84991, A (株式会社京都第一科学) 7. 4月. 1998 (07. 04. 98) ファミリーなし	1-12

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PATENT COOPERATION T R A T Y

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION
(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C.20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing: 23 March 2000 (23.03.00)	
International application No.: PCT/JP99/04933	Applicant's or agent's file reference: 99312M
International filing date: 10 September 1999 (10.09.99)	Priority date: 10 September 1998 (10.09.98)
Applicant: NEMORI, Ryoichi et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:

10 September 1999 (10.09.99)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

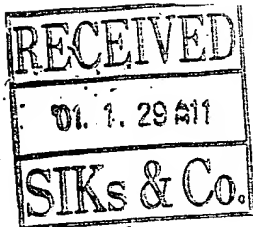
2. The election, ☒ was

☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

<p>The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland</p> <p>Facsimile No.: (41-22) 740.14.35</p>	<p>Authorized officer:</p> <p>J. Zahra</p> <p>Telephone No.: (41-22) 338.83.38</p>
--	--

THIS PAGE BLANK (USPTO)



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL
OF COPIES OF TRANSLATION
OF THE INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT

(PCT Rule 72.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

IMAMURA, Masazumi
KRF Building, 5th Floor
5-5, Kyobashi 1-chome
Chuo-ku, Tokyo 104-0031
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 11 January 2001 (11.01.01)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 99312M	
International application No. PCT/JP99/04933	International filing date (day/month/year) 10 September 1999 (10.09.99)
Applicant FUJI PHOTO FILM CO., LTD. et al	

1. Transmittal of the translation to the applicant.

The International Bureau transmits herewith a copy of the English translation made by the International Bureau of the international preliminary examination report established by the International Preliminary Examining Authority.

2. Transmittal of the copy of the translation to the elected Offices.

The International Bureau notifies the applicant that copies of that translation have been transmitted to the following elected Offices requiring such translation:

EP,AT,AU,CA,CH,CN,CZ,FI,NO,NZ,PL,RO,RU,SK,US

The following elected Offices, having waived the requirement for such a transmittal at this time, will receive copies of that translation from the International Bureau only upon their request:

AP,EA,AE,AL,AM,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CR,CU,DE,DK,DM,EE,ES,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MD,MG,MK,MN,MW,MX,PT,SD,SE,SG,SI,SL,TJ,TM,TR,TT,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW,OA

3. Reminder regarding translation into (one of) the official language(s) of the elected Office(s).

The applicant is reminded that, where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary examination report.

It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned (Rule 74.1). See Volume II of the PCT Applicant's Guide for further details.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colmbettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer Elliott Peretti Telephone No. (41-22) 338.83.38
---	--

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 99312M	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP99/04933	International filing date (day/month/year) 10 September 1999 (10.09.99)	Priority date (day/month/year) 10 September 1998 (10.09.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC G01N 21/75, 31/00, 33/68, 33/52		
Applicant FUJI PHOTO FILM CO., LTD.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 3 sheets, including this cover sheet.
- ☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).
- These annexes consist of a total of sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 10 September 1999 (10.09.99)	Date of completion of this report 06 June 2000 (06.06.2000)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/04933

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the claims:
pages _____, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/04933

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**1. Statement**

Novelty (N)	Claims		YES
	Claims	1-12	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-12	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-12	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations**Concerning claims 1-12**

Document 1: JP, 6-16619, A (Terumo Corporation), 25 January, 1994 (25.01.94)

Document 2: JP, 63-247656, A (Miles Inc.), 14 October, 1988 (14.10.88)

Document 3: JP, 5-130897, A (Terumo Corporation), 28 May, 1993 (28.05.93)

Document 4: JP, 62-228947, A (Fuji Photo Film Co., Ltd.), 7 October, 1987 (07.10.87)

Document 5: JP, 10-84991, A (KDK Corporation), 7 April, 1998 (07.04.98)

Document 1 discloses a method for detecting a thiol-group-containing compound in which a sample containing a thiol-group-containing compound is made to come into contact with a thin film that contains a metal such as copper, zinc, nickel or cobalt, and the resulting change in the color of the thin film is detected.

Document 2 discloses a method for detecting a thiol-group-containing compound in which iron oxide is used in the measurement reagent, and document 3 discloses a method for detecting a thiol-group-containing compound in which cobalt is used in the measurement reagent.

Moreover, as can be seen from the disclosures in documents 4 and 5, it is considered that, when preparing a slide to be used in analysis, a person skilled in the art would as required be able to mix in things like a crosslinking agent and a hydrophilic binder along with the measurement reagent.

It is thus considered that, in the case of the methods for detecting thiol-group-containing compounds disclosed in documents 1-3, mixing in things like a crosslinking agent and a hydrophilic binder as disclosed in documents 4 and 5, thus arriving at the constituent features of the inventions of the present application, would be obvious to a person skilled in the art.



THIS PAGE BLANK (USPTO)



P.B.5818 - Patentlaan 2
2280 HV Rijswijk (ZH)
☎ +31 70 340 2040
TX 31651 epo nl
FAX +31 70 340 3016

Europäisches
Patentamt

Zweigstelle
in Den Haag
Recherchen-
abteilung

European
Patent Office

Branch at
The Hague
Search
division

Office européen
des brevets

Département à
La Haye
Division de la
recherche

7.W.

HOFFMANN - EITLE
Patent- und Rechtsanwälte
Arabellastrasse 4
81925 München
ALLEMAGNE

EINGEGANGEN

- 2. Sep. 2002

HOFFMANN • EITLE, MÜNCHEN
PATENTANWÄLTE RECHTSANWÄLTE

Datum/Date

02.09.02

Zeichen/Ref./Réf.

86 906 a/fi

Anmeldung Nr./Application No./Demande n°/Patent Nr./Patent No./Brevet n°.

99943265.1-2204-JP9904933

Anmelder/Applicant/Demandeur/Patentinhaber/Proprietor/Titulaire

FUJI PHOTO FILM CO., LTD.

COMMUNICATION

The European Patent Office herewith transmits as an enclosure the European search report for the above-mentioned European patent application.

If applicable, copies of the documents cited in the European search report are attached.

☒ Additional set(s) of copies of the documents cited in the European search report is (are) enclosed as well.

REFUND OF THE SEARCH FEE

If applicable under Article 10 Rules relating to fees, a separate communication from the Receiving Section on the refund of the search fee will be sent later.



THIS PAGE BLANK (UNLESS)



European Patent
Office

**SUPPLEMENTARY
PARTIAL EUROPEAN SEARCH REPORT**

Application Number

which under Rule 45 of the European Patent Convention shall be considered, for the purposes of subsequent proceedings, as the European search report

EP 99 94 3265

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category	Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant to claim	CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int.CI.7)
✓ X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 015, no. 141 (C-0822), 10 April 1991 (1991-04-10) & JP 03 021331 A (IDEMITSU KOSAN CO LTD), 30 January 1991 (1991-01-30) * abstract *	9, 10	G01N31/00 G01N21/75 G01N33/68 G01N33/52 G01N31/22
✓ Y	----- PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 1995, no. 07, 31 August 1995 (1995-08-31) & JP 07 097767 A (DAISO CO LTD), 11 April 1995 (1995-04-11) * abstract *	1-12	
✓ Y	----- PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 018, no. 222 (C-1193), 21 April 1994 (1994-04-21) & JP 06 016619 A (TERUMO CORP), 25 January 1994 (1994-01-25) * abstract *	1-12	
	----- -/--		
			TECHNICAL FIELDS SEARCHED (Int.CI.7)
			G01N
The supplementary search report has been based on the last set of claims valid and available at the start of the search.			
INCOMPLETE SEARCH			
The Search Division considers that the present application, or some or all of its claims, does/do not comply with the EPC to such an extent that a meaningful search into the state of the art cannot be carried out, or can only be carried out partially, for the following claims: Claims searched completely : Claims searched incompletely : Claims not searched : Reason for the limitation of the search: see sheet C			
Place of search MUNICH		Date of completion of the search 20 August 2002	Examiner Michalitsch, R
CATEGORY OF CITED DOCUMENTS X : particularly relevant if taken alone Y : particularly relevant if combined with another document of the same category A : technological background O : non-written disclosure P : intermediate document T : theory or principle underlying the invention E : earlier patent document, but published on, or after the filing date D : document cited in the application L : document cited for other reasons & : member of the same patent family, corresponding document			

7
EPO FORM 1503 03.02 (P04C20)

THIS PAGE BLANK (USPTO)



European Patent
Office

PARTIAL EUROPEAN SEARCH REPORT

Application Number
EP 99 94 3265

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int.Cl.7)
Category	Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant to claim	
✓ A	EP 0 546 939 A (MOLECULAR BIOQUEST INC) 16 June 1993 (1993-06-16) * claims 6-9 * -----	9,10	
			TECHNICAL FIELDS SEARCHED (Int.Cl.7)

7

EPO FORM 1503 03.82 (P04C10)

THIS PAGE BLANK (02/20)



Claim(s) searched incompletely:
1-12

Reason for the limitation of the search:

The application does not comply with Art. 84 EPC for the following reasons:

Claim 1.

I) Claim 1 lacks support, in breach of Art. 84 EPC, because the invention cannot be exploited over the whole range.

According to claim 1 alkali metals such as sodium or potassium etc. also fall in the scope of the claim. These metals, however, cannot be employed, because their chemical properties render the related microparticles unstable under ambient conditions. Such particles are therefore inappropriate for the method of claim 1, which is carried out under ambient conditions.

Actually most of the claimed metals would be oxidised. Thiols on the other hand, do not react with or adsorb onto most metal oxides to provide a color change. Consequently these metals and the related oxides cannot be employed in the method of claim 1.

II) The same arguments apply with respect to the metal compounds in claim 1 and the metals and metal compounds in claims 3 and 4.

III) Furthermore, the examples exclusively deal with silver nanoparticles.

Claims 6-8.

I) Claim 6 is unclear since it contains compounds that do NOT or not necessarily contain thiol groups such as amino acids, proteins, peptides...

II) Claim 7 is unclear since "biosamples" are not thiol-containing compounds.

Since claim 7 is unclear, the subject matter of claim 8 is unclear too.

Claim 9.

Claim 9 is unclear because the wording leaves the reader in doubt whether the claim is directed towards the membrane or its use.

In conclusion, the claims are so broad, so unclear and so lack support that a meaningful search over the whole range is not possible.

Therefore, the application was searched only insofar as it relates to the following subject matter:

-A method for determining a thiol-compound comprising the steps of contacting a sample that contains a thiol-group containing compound with
-a membrane comprising:

THIS PAGE BLANK (USPTO)



- microparticles of a metal or a metal compound selected from the group of gold, silver, copper, platinum, palladium, osmium, rhuthenium, cobalt, and iron, and the oxides and halides thereof.
- and a hydrophilic binder
- observing a change in color of the membrane
- the membrane per se was also searched

THIS PAGE BLANK (user)

**ANNEX TO THE EUROPEAN SEARCH REPORT
ON EUROPEAN PATENT APPLICATION NO.**

EP 99 94 3265

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned European search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

20-08-2002

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
JP 03021331	A	30-01-1991	NONE		
JP 07097767	A	11-04-1995	JP	3003473 B2	31-01-2000
JP 06016619	A	25-01-1994	NONE		
EP 0546939	A	16-06-1993	US	5225282 A	06-07-1993
			CA	2084970 A1	14-06-1993
			EP	0546939 A1	16-06-1993
			US	5382468 A	17-01-1995

THIS PAGE BLANK (UPPER)